

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-116378

(43)Date of publication of application : 25.04.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
A01K 67/027  
// C12N 5/10

(21)Application number : 11-316583

(71)Applicant : NATL INST OF ANIMAL INDUSTRY  
HIROSHIMA UNIV

(22)Date of filing : 17.01.1997

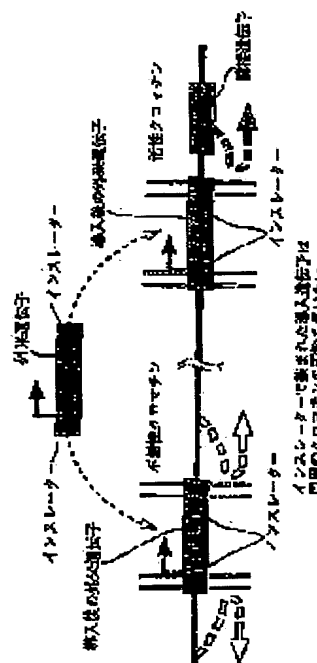
(72)Inventor : YASUE HIROSHI  
SHIMADA HIROSHI  
AKASAKA KOUJI

(54) TRANSDUCTION OF EXTRANEEOUS GENE INTO CULTURED CELL OR FERTILIZED EGG

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for transducing a gene, in which the transduced extraneous gene exactly functions and prepare a transgenic organism coinciding with a target.

SOLUTION: This invention relates to a method for transducing an extraneous gene. When an extraneous gene is transduced into a cultured cell or a fertilized egg, the extraneous gene to be transduced is placed between insulators so that the gene may not be interfered by surrounding genes after its transduction and may be transduced while the extraneous gene can secure its independent environment from the surrounding genes. In such a manner, the interference from the surrounding genes is interrupted completely whereby the transduced extraneous gene can be stably and normally expressed on a chromosomal DNA in the cultured cell or fertilized egg, independently from the position of the gene insertion on the chromosome to contribute to the efficiency-increased formation of a transgenic organism.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

08.11.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3116091

[Date of registration]

06.10.2000

[Number of appeal against examiner's decision]

BEST AVAILABLE COPY

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2000-116378  
(P2000-116378A)

(43)公開日 平成12年4月25日(2000.4.25)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
// C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B

審査請求 有 請求項の数3 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平11-316583  
(62)分割の表示 特願平9-6550の分割  
(22)出願日 平成9年1月17日(1997.1.17)

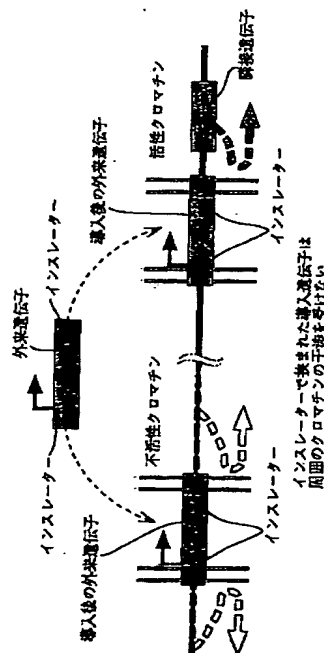
(71)出願人 390026169  
農林水産省畜産試験場長  
茨城県稲敷郡基崎町池の台2  
(71)出願人 597007248  
広島大学長  
広島県東広島市鏡山一丁目3番2号  
(72)発明者 安江 博  
茨城県つくば市竹園3-34-762-1  
(72)発明者 嶋田 拓  
広島県広島市東区牛田南2-1-31  
(72)発明者 赤坂 甲治  
広島県東広島市八本松南4-20-26  
(74)代理人 100063565  
弁理士 小橋 信淳

(54)【発明の名称】 培養細胞または受精卵に外来遺伝子を導入する方法

(57)【要約】

【課題】 導入された外来遺伝子が正しく機能し目的に合致したトランスジェニック生物を作成するための遺伝子導入方法を提供する。

【解決手段】 外来遺伝子の導入方法であって、培養細胞または受精卵に外来遺伝子を導入する際に、導入後の外来遺伝子が周囲の遺伝子からの干渉を受けないように、導入しようとする外来遺伝子を、インスレーターで挟み独立した環境を確保した状態で染色体DNAに導入する。このように周囲遺伝子からの干渉を遮断することで、導入された遺伝子は染色体上の挿入位置に依存せず、導入後の外来遺伝子が培養細胞または受精卵内の染色体DNA上で安定的に正常発現することが保証されるようになり、トランスジェニック生物作成の効率化に寄与できる。



BEST AVAILABLE COPY

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 培養細胞または受精卵に外来遺伝子を導入する際に、導入後の外来遺伝子が周囲の遺伝子からの干渉を受けないように、導入しようとする外来遺伝子を、インスレーターで挟み独立した環境を確保した状態で染色体DNAに導入し、上記インスレーターとして、ウニ・アリアルスルファターゼ（Ars）遺伝子の上流-2686bp~-2115bpに存在するインスレーター・フラグメントを用い、該インスレーター・フラグメントとして、アリアルスルファターゼ遺伝子のエンハンサーとプロモーターとの間に挿入されるとアリアルスルファターゼ遺伝子のエンハンサーの活性を完全に遮断できるものを用いる外来遺伝子の導入方法において、上記インスレーター・フラグメントは、導入しようとする外来遺伝子を挟むようにプラスミドに配置され、実際の遺伝子導入操作では、導入される外来遺伝子（DNA）とインスレーター・フラグメントとを同じ制限酵素末端を持つように直鎖化し、混ぜて受精卵に導入することを特徴とする外来遺伝子の導入方法。

【請求項2】 受精卵に導入される外来遺伝子（DNA）に対し、制限酵素を用いることで、制限酵素末端を持つように直鎖化し、そして、重量比で8倍量の同じ制限酵素で完全消化したバフンウニ染色体DNAと、同じ制限酵素末端を持つように直鎖化したインスレーター・フラグメントと混合させて、1mlあたり0.5mgのDNAを含む溶液を調製することを特徴とする請求項1記載の外来遺伝子の導入方法。

【請求項3】 外来遺伝子が不活性クロマチンDNA上に導入された場合は、該外来遺伝子を挟むように位置している両側のインスレーターにより、不活性クロマチンDNAからの影響を遮断することで、導入後の外来遺伝子が不活性になることを回避し、一方、外来遺伝子が活性クロマチンDNA上に導入された場合は、該外来遺伝子を挟むように位置している両側のインスレーターにより、強力なエンハンサーの支配を遮断することで、外来遺伝子の過剰発現や、異常な時期特異的、組織特異的な遺伝子の発現を回避することを特徴とする請求項1記載の外来遺伝子の導入方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生物研究分野、医学研究分野、畜産研究分野、水産研究分野における外来遺伝子の導入技術に関し、詳しくは、これらの分野において培養細胞または受精卵に外来遺伝子を導入する方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】近年、外来遺伝子の導入技術が発展するにつれて、新たに有用な形質を付加させた生物品種の創出が可能となり、トランスジェニック生物作成として画期的な研究成果があがりつつある。

【0003】なお、外来遺伝子の導入技術としては、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、顕微注入法、ウイルスベクター法などにより、プラスミドベクターにクローニングされた外来遺伝子を培養細胞または受精卵に導入する操作が行われている。

【0004】また、外来遺伝子の導入技術としては、パーティクルガン（空気銃のような装置）を用いた遺伝子導入法も知られている。従来、パーティクルガンによる遺伝子導入法は、主として細胞壁を持つ植物細胞に適用され、外来遺伝子の導入が可能となったことで植物の種類を飛躍的に増大させてきた。さらに最近では、パーティクルガンを用いて動物卵に外来遺伝子を導入する方法も提案されている。

【0005】パーティクルガンを用いて動物卵に外来遺伝子を導入する方法は、例えば、ウニ卵に外来遺伝子を導入するときに利用されており、また他の無脊椎動物卵に外来遺伝子を導入するときにも利用されている。そして、多少の改良により堅い卵殻を持つ魚卵にも遺伝子を導入することが可能であり、多数の卵を同時に処理できる点で魚介類の品種改良への道が開かれると考えられている。

【0006】なお、パーティクルガンを用いて動物卵に外来遺伝子を導入する方法では、具体的には、遺伝子（DNA）を沈着させた金やタングステンなどの微粒子をガス圧で加速し、培養細胞または受精卵に打ち込むようにしている。このように外来遺伝子を動物卵に導入した後、導入後の遺伝子がプリズム胚でも認められており、金属粒子は何らかの機構で胚から取り除くことが可能となっている。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】ところが、上述した複数種の遺伝子導入方法を用いた場合には何れも、外来遺伝子が導入される染色体DNA上の位置は、現在の技術ではコントロールできない。従って、培養細胞または受精卵内において、導入後の外来遺伝子が周囲（隣接）の遺伝子の環境にさらされることになり、正常に発現しない場合が多い。

【0008】つまり、図2に示すように、外来遺伝子が不活性クロマチンDNA上に導入された場合は、該外来遺伝子が不活性になってしまう。一方、外来遺伝子が活性クロマチンDNA上に導入された場合は、強力なエンハンサーの支配を受けるので、外来遺伝子の過剰発現や、時期特異的、組織特異的な遺伝子の発現がコントロール不能という問題が生じてくる。

【0009】上述したことから、さらに図2に示すように、外来遺伝子が不活性クロマチンDNA上に導入された場合は、トランスジェニック生物の作成効率が著しく低くなっている。一方、外来遺伝子が活性クロマチンDNA上に導入された場合は、導入後の遺伝子がコントロ

ール不能の遺伝子として発現してしまう。結局、所要の目的に合致したトランスジェニック生物を作成することが難しくなる。

【0010】要するに、上述した複数種の遺伝子導入方法では何れも、導入された外来遺伝子が正しく機能するトランスジェニック生物があまり期待できず、期待できるとしても、色々な複雑な操作が必要となってくるので、トランスジェニック生物の作成に多大な労力と時間を必要とする。

【0011】本発明は、上述した問題点を解消するためになされたものであり、導入された外来遺伝子が正しく機能し目的に合致したトランスジェニック生物を作成するための遺伝子導入方法を提供しようとしている。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために本発明は、外来遺伝子の導入方法であって、培養細胞または受精卵に外来遺伝子を導入する際に、導入後の外来遺伝子が周囲の遺伝子からの干渉を受けないように、導入しようとする外来遺伝子を、インスレーターで挟み独立した環境を確保した状態で染色体DNAに導入し、上記インスレーターとして、ユニ・アリアルスルファターゼ(Ars)遺伝子の上流-2686bp~-2115bpに存在するインスレーター・フラグメントを用い、該インスレーター・フラグメントとして、アリアルスルファターゼ遺伝子のエンハンサーとプロモーターとの間に挿入されるとアリアルスルファターゼ遺伝子のエンハンサーの活性を完全に遮断できるものを用いる外来遺伝子の導入方法において、上記インスレーター・フラグメントは、導入しようとする外来遺伝子を挟むようにプラスミドに配置され、実際の遺伝子導入操作では、導入される外来遺伝子(DNA)とインスレーター・フラグメントとを同じ制限酵素末端を持つように直鎖化し、混ぜて受精卵に導入することを特徴とする。

【0013】また本発明は、受精卵に導入される外来遺伝子(DNA)に対し、制限酵素を用いることで、制限酵素末端を持つように直鎖化し、そして、重量比で8倍量の同じ制限酵素で完全消化したバフンウニ染色体DNAと、同じ制限酵素末端を持つように直鎖化したインスレーター・フラグメントと混合させて、1mlあたり0.5mgのDNAを含む溶液を調製することを他の特徴とするものである。

【0014】さらに本発明は、外来遺伝子が不活性クロマチンDNA上に導入された場合は、該外来遺伝子を挟むように位置している両側のインスレーターにより、不活性クロマチンDNAからの影響を遮断することで、導入後の外来遺伝子が不活性になることを回避し、一方、外来遺伝子が活性クロマチンDNA上に導入された場合は、該外来遺伝子を挟むように位置している両側のインスレーターにより、強力なエンハンサーの支配を遮断することで、外来遺伝子の過剰発現や、異常な時期特異

的、組織特異的な遺伝子の発現を回避することをもう一つの特徴とするものである。

【0015】なお、本発明の方法による遺伝子導入時の操作も、従来のパーティクルガンによる遺伝子導入法を使用することが可能である。すなわち、外来遺伝子(DNA)を沈着させた金の微粒子をガス圧で加速して培養細胞または受精卵に打ち込む方法を利用できる。

【0016】

【作用】上記した本発明の方法によれば、図1に示すように、培養細胞または受精卵に外来遺伝子を導入する際に、導入後の外来遺伝子が周囲の遺伝子からの干渉を受けないように、導入しようとする遺伝子を、インスレーターで挟み独立した環境を確保した状態で染色体DNAに導入することから、導入後の外来遺伝子は、導入先の培養細胞または受精卵内で隣接遺伝子からの干渉を受けずに済むようになっている。

【0017】すなわち、図1に示すように、外来遺伝子が不活性クロマチンDNA上に導入された場合は、該外来遺伝子を挟むように位置している両側のインスレーターにより、不活性クロマチンDNAからの影響を遮断することができ、導入後の外来遺伝子が不活性になることが避けられる。一方、外来遺伝子が活性クロマチンDNA上に導入された場合は、該外来遺伝子を挟むように位置している両側のインスレーターにより、強力なエンハンサーの支配を遮断することができるので、外来遺伝子の過剰発現や、異常な時期特異的、組織特異的な遺伝子の発現が回避できるようになる。

【0018】このように隣接遺伝子からの干渉を遮断することで、導入された遺伝子は染色体上の挿入位置に依存せず、導入後の外来遺伝子が培養細胞または受精卵内の染色体DNA上で安定的に正常発現することが保証されるようになり、トランスジェニック生物作成の効率化に寄与できる。

【0019】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明する。なお、以下の実施例では、バフンウニ・アリアルスルファターゼ(Ars)遺伝子の上流-2686bp~-2115bpに存在するインスレーター・フラグメントを用いる。すなわち、導入される外来遺伝子を挟むように上記インスレーター・フラグメントをプラスミド上に配置することで、受精卵に導入された外来遺伝子が周囲の隣接遺伝子からの影響を受けなくて済むという原理を利用している。なお、実際の遺伝子導入操作では、導入される外来遺伝子(DNA)とインスレーター・フラグメントとを同じ制限酵素末端を持つように直鎖化し、混ぜて受精卵に導入するだけで、インスレーターの機能が充分に発揮できるようになっている。

【0020】受精卵の作成

日本近海で取れたバフンウニの卵を海水中で受精させ、そして受精卵を2回にわたって海水で洗った。その後、

受精卵の胚体積0.15mlを取り、シャーレの中に敷いた濾紙上に均一になるように散布した。このようにして、受精後のウニ卵は、濾紙の繊維に挟まれて固定された。

【0021】遺伝子(DNA)を沈着した金粒子の作成  
上記の受精卵に導入される遺伝子(DNA)に対し、制限酵素を用いることで、ある制限酵素末端を持つように直鎖化し、そして、重量比で8倍量の同じ制限酵素で完全消化したバフンウニ染色体DNAと、同じ制限酵素末端を持つように直鎖化したインスレーター・フラグメントと混合させて、1mlあたり0.5mgのDNAを含む溶液を調製した。そして、2.5mgの乾燥金粒子(直径約1 $\mu$ m、100%のエタノール中で音波洗浄したもの)を上記のDNA溶液20 $\mu$ lに懸濁し、12 $\mu$ lのPEG溶液(ポリエチレングリコールを20重量%の濃度になるように2.5M NaClに溶かし、オートクレーブで滅菌処理したもの)を添加して20分間氷冷した。これによって、DNAが金粒子に沈着した。その後、軽く遠心分離して上清を取り除いてから、遺伝子(DNA)を沈着させた金粒子を得た。このように遺伝子(DNA)を沈着した金粒子は、ボルテックスミキサーを用いて62.5 $\mu$ lの100%エタノールに懸濁することで更に処理された。

【0022】受精卵への遺伝子導入

DNAを沈着した金粒子0.8mgをプロジェクトイルに載せてパーティクルガンにセットし、0.1気圧程度の減圧下で初速度350m/sで発射し、濾紙上に固定した受精卵に撃ち込んだ。

【0023】導入後の外来遺伝子の正常発現性に対する評価

上記インスレーター・フラグメントを用いることによ

＊て、受精卵に導入された外来遺伝子が周囲の隣接遺伝子からの影響を受けなくて済むということが、クロラムフェニコールアセチル基転移酵素(chloramphenicol acetyltransferase,以下CATと称す)および発光生物(例えばホタル)由来のルシフェラーゼ(luciferase,以下lucと称す)という2種類のレポーター遺伝子(reporter gene)を使用することによって確認されている。

【0024】ここでCATとlucは、テスト用の遺伝子として用いられており、それぞれウニのヒストンH1遺伝子、アリールスルファターゼ遺伝子のプロモーターの下流側に連結され、その融合遺伝子の産物の活性を測定することにより、導入された外来遺伝子が正常に発現していることを確認できた。

【0025】

【発明の効果】上記した本発明の方法によれば、インスレーターで挟まれた外来遺伝子は、培養細胞または受精卵内に導入された後、周囲遺伝子の影響を受けないため、導入された遺伝子は染色体上の挿入位置に依存せず、安定的な発現が保証される。従って、本発明の方法は、トランスジェニック生物作成の効率化に寄与できる。

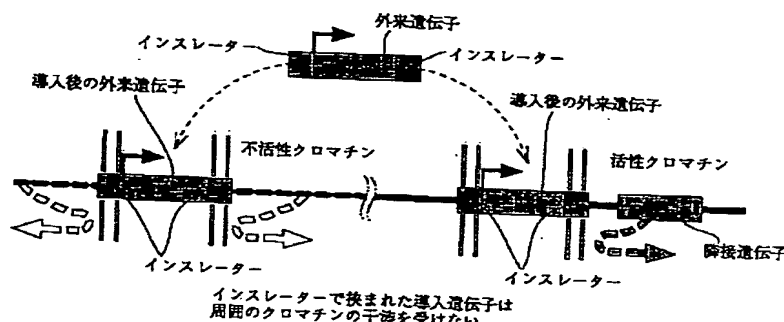
【0026】トランスジェニック生物作成の効率化により、基礎研究では種々の遺伝子の機能解析、細胞分化の分子のメカニズム、発ガン機構の遺伝子レベルでの研究が促進されると共に、応用研究では遺伝子治療、遺伝子導入による品種改良が促進される。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明方法におけるメカニズムを説明する原理図である。

【図2】従来方法におけるメカニズムを説明する原理図である。

【図1】



【図2】

